



TITLE:

Improvement of the Performance of Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis Based on the Understanding of the Interaction between Redox Enzymes and Electrodes( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Hong-Qi, Xia

---

CITATION:

Hong-Qi, Xia. Improvement of the Performance of Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis Based on the Understanding of the Interaction between Redox Enzymes and Electrodes. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-09-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20715>

RIGHT:

京都大学	博士（農学）	氏名	夏 洪 斉
論文題目	Improvement of the Performance of Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis Based on the Understanding of the Interaction between Redox Enzymes and Electrodes (酸化還元酵素と電極間の相互作用の理解に基づいた直接電子移動型酵素機能電極反応特性の向上)		
(論文内容の要旨)			
<p>酸化還元酵素と電極間で直接電子授受する反応は、直接電子移動（DET）型酵素機能電極反応（以下「DET 反応」と略称）とよばれる。DET 反応系は酸化還元酵素と電極だけから構成されるため、最も理想的な酵素機能電極反応であり、バイオセンサやバイオ燃料電池など様々な電気化学デバイスへの応用が強く期待されている。しかし、ほとんどの酵素は活性中心がポリペプチドに覆われているため、電極とは容易に DET 反応できない。これまでの研究より、酵素－電極間での標準電子移動速度定数は、酵素活性中心と電極間の距離の増加に伴い指数関数的に減少することが分かっている。また、電極の表面構造と表面官能基が酵素の吸着配向性に影響を与えることも考えられる。本研究では、酵素－電極間の相互作用を理解することにより、DET 反応の特性を向上させることを目指した。</p> <p>第 1 章では、多孔質電極の穴の曲率半径が酵素のそれに近づくと、酵素の DET 反応部位と電極との近距離接触確率が向上するというモデルのもと、多孔質特性が DET 反応に与える影響を調べた。過酸化水素還元反応を触媒するペルオキシダーゼを、グラッシーカーボン平板電極及びケッチェンブラックで修飾した多孔質電極に吸着させ、それぞれの DET 反応特性を評価した。その結果、平板電極では観測できなかった DET 反応を多孔質電極で明瞭に観測することに成功した。また、酵素とカーボンナノチューブ（CNT）を混合し、酵素特性に合わせたオーダーメイド型三次元構造をもつ多孔質酵素電極を構築した結果、初めてペルオキシダーゼの非触媒酸化還元波の測定に成功した。これは、電極表面に形成された三次元構造に酵素が適切に埋め込まれることにより、酵素の DET 反応部位と電極間の距離が短くなり標準電子移動速度定数が大きくなったためと考えられ、上記モデルの妥当性を示した。一方、この応用として、基質による酸素還元によって過酸化水素を生成する酸化酵素をペルオキシダーゼと同時に多孔質炭素電極上に吸着させることにより、メディエータを使わず、酸化酵素の基質を特異的に検出できる二酵素型バイオセンサを構築できることを示した。</p> <p>第 2 章では、酵素－電極間の静電相互作用が DET 反応に与える影響を調べた。鎖長が異なる 3 種類の CNT を用いて、酸素還元反応を触媒するマルチ銅オキシダーゼに吸着させ、DET 反応特性を調べた。モデル酵素としてはビリルビン酸化酵素（BOD）と銅-エフラックス酸化酵素（CueO）を用いている。その結果、BOD の場合には、CNT 鎖長が短くなると共に、限界触媒電流が増加し、電流－電圧曲線のシグモイド形状がより急峻になった。一方、CueO の場合には、CNT の鎖長が短くなると共に、限界触媒電流が減少し、電流－電圧曲線のシグモイド形状がより平坦になった。これらの実験結果を解釈するために、まず CNT の末端に多く存在するカルボキシ基が中性溶液中では負に帯電していることに着目し、そのゼータ電位に基づいて表面に存在する負電荷密度を計算したところ、その値は、鎖長が短くなるとともに増加することがわかった。一方、同じ中性溶液中において、BOD の電極との DET 反応部位は正に帯電し、CueO では負に帯電している。したがって、BOD の場合は、酵素－電極間の静電引力が CNT 鎖長の減少と</p>			

ともに増加し、DET 反応に都合の良い配向が増えるため DET 反応の特性が向上するのに対し、CueO の場合はその逆になる。以上のように得られた実験結果が酵素－電極間の静電相互作用を考慮してうまく説明できることをふまえ、さらに、DET 反応部位が負に帯電しているヒドロゲナーゼ (H<sub>2</sub>ase) に対して CNT 鎖長と DET 反応活性の関係を調べたところ、上記のモデルに基づいた考え方を支持する結果が得られた。

第 3 章では、第 1 章と第 2 章で得た知見を基に、多孔質電極表面に負または正電荷を持つ化合物を化学修飾することにより、酵素の配向を改良することを目指した。DET 反応部位が正に帯電している BOD の場合には、*p*-アミノ安息香酸を修飾した多孔質電極を用いることにより、酸素還元電流密度を大幅に増加できた。一方、DET 反応部位が負に帯電している H<sub>2</sub>ase の場合には、*p*-フェニレンジアミンを化学修飾した多孔質電極を用いることにより、水素酸化電流密度を大幅に増加できた。また、電解による電極表面でのガス性基質の枯渇を防ぐため、ガス拡散電極を構築し、電流密度をさらに向上させることにも成功した。このようにして作成した水素酸化アノードと酸素還元カソードを組み合わせたところ、室温・静止条件で、理論値 1.22 V に極めて近い 1.12 V の開回路電圧を示し、最大出力密度も 6.1 mW cm<sup>-2</sup> と、水素と酸素で発電するバイオ燃料電池としてきわめて高い性能が得られた。また、フルクトース脱水素酵素はメトキシ基に対する特異的認識機能があると考え、メトキシ基を持つ化合物を多孔質電極上に修飾することにより、フルクトース脱水素酵素の DET 反応の特性を向上できることも実験的に証明した。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

酵素反応と電極反応を直接共役させた直接電子移動 (DET) 型酵素電極反応は、バイオ電池やバイオセンサなどへの広範な応用展開が期待されるため世界的に注目を集めている。しかし、ほとんどの酵素は活性中心がポリペプチドに覆われているため、必ずしも電極と効率よく電子授受できるとは限らない。実際、DET型酸化還元酵素の報告例は少なく、現状ではその応用展開例も限られている。

このような背景のもと、本論文では、酵素－電極間の相互作用を理解することにより、DET反応の特性を飛躍的に向上させることを目指した。本論文で評価できる点は以下の通りである。

1. 多孔質材料が与える穴の曲率特性を利用し、酵素の電子授受部位と電極間の近距離接触確率を向上させることにより、平板電極上では観測できないDET反応を実現した。また、酵素とカーボンナノチューブ (CNT) を混合し、オーダーメード型三次元構造をもつ多孔質酵素電極を作成し、ペルオキシダーゼの非触媒酸化還元波を初めて観測した。

2. 表面が負に帯電するCNTを多孔性電極材料として用い、ビリルビン酸化酵素、カップラエフラックス酸化酵素、及びヒドロゲナーゼのDET反応に与えるCNTの鎖長の影響を調べた。得られた実験結果から、酵素のDET反応部位周辺と電極表面との静電相互作用により、酵素が電極上に規則的に配向することを提唱した。

3. 2.に基づき、多孔質電極表面に負または正電荷を有する化合物を化学修飾し、酵素の配向を制御することでDET活性を大幅に向上できることを示した。改良したバイオ電極を水素/空気バイオ燃料電池に応用したところ、室温・静止下で極めて高い出力密度を示した。また、酵素への親和性が期待されるメトキシ基を持つ化合物を多孔質電極上に修飾することにより、フルクトース脱水素酵素のDET反応の特性を向上できることも示した。

以上のように、本論文は、多孔質電極の穴の曲率特性を調節することで酵素－電極間電子移動速度定数を向上でき、また酵素－電極間の静電相互作用に基づいて酵素の配向性を制御できることを示した。さらにこれらの手法を組み合わせることによる高性能な電気化学デバイスの構築に成功しており、その成果は、生物電気化学、材料化学、酵素科学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年7月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)